

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ ДИМЕБОНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПРИМЕНЕНИИ НА ПОВЕДЕНИЕ И ПАМЯТЬ МЫШЕЙ SAMP 10

В. В. Григорьев¹, Т. Л. Гарибова², Т. А. Воронина², С. А. Литвинова²,
С. О. Бачурин¹

У мышей линии SAMP10 (Senescence-accelerated mouse prone10) с генетически детерминированным ускоренным старением в 16-месячном возрасте в сравнении 3-месячными животными той же породы отмечались характерные для старых животных дефицит поведения и памяти, снижение ориентировочно-исследовательского поведения, повышенный уровень тревожности. Димебон при длительном применении (1,5 мг/кг в день в течение 5 мес) оказывал позитивное влияние на поведение и память 16-месячных мышей SAMP10. Наблюдалась оптимизация ориентировочно-исследовательского поведения в “открытом поле”, снижение уровня тревожности на модели приподнятого крестообразного лабиринта, улучшение воспроизведения условного рефлекса пассивного избегания.

Ключевые слова: мыши линии SAMP 10 (Senescence-accelerated mouse prone 10), димебон, поведение, память

ВВЕДЕНИЕ

Димебон (3,6-диметил-9-(2-метил-пиридинил-5)-этил-1,2,3,4-тетрагидро-гамма-карболина дигидрохлорид) первоначально, за счет блокирования гистаминовых H₁-рецепторов, использовали как антигистаминный препарат [5, 6, 10]. Позднее у димебона были выявлены нейропротекторные свойства. В частности, в экспериментальных исследованиях было показано, что препарат эффективен на моделях холинергического дефицита, вызванного нейротоксинами AF64A [5] и фрагментом β-амилоида Aβ_{25–35}, [6]. Нейропротекторные свойства димебона подтверждены клиническими испытаниями на больных в начальной стадии болезни Альцгеймера [10]. Учитывая особенности спектра фармакологической активности димебона, представляло интерес исследовать возможности использования препарата в качестве геропротектора. Одной из современных моделей ускоренного старения рассматривают линии мышей SAMP (senescence-accelerated mouse prone, SAMP1,2,3,6,7,8,9,10,11) с генетически детерминированным ускоренным старением [16, 17]. Данные генотипирования с использованием микросателлитных маркеров позволили предположить, что у этих мышей четыре локуса, расположенных в хромосомах 4, 14, 16 и 17, содержат гены, ответственные за ускоренное старение [1, 12, 16, 17]. У животных SAMP отмечают признаки преждевременного старения и более короткая продолжительность жизни. В частности,

у линии SAMP10, начиная с 4-го месяца жизни, в результате накопления повреждений ДНК [14], отложения в различных областях мозга Aβ-амилоида [18], повышенного уровня перекисного окисления липидов [9, 11], потери кортикальных синапсов и других патологических процессов развиваются неврологический дефицит, депрессия, эмоциональная дезориентация, повышенная тревожность, ухудшение памяти и способности к обучению и другие отклонения [3, 11 – 13, 15].

Целью настоящего исследования явилось изучения влияния димебона при длительном применении в питьевой воде на психофизиологический статус мышей линии SAMP 10.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на мышцах-самцах линии SAMP 10 (с генетически детерминированным ускоренным старением) массой 25 – 35 г, содержащихся в стандартных клетках в условиях естественного светового режима при свободном доступе к питью и стандартному гранулированному корму. В 10 месяцев жизни мыши были случайным образом разделены на 2 группы по 13 животных в каждой: одна группа мышей получала только питьевую воду (“старый” контроль), вторая — димебон в дозе 1,5 мг/кг в виде питьевого раствора ежедневно на протяжении 5 месяцев. Для сравнительной оценки признаков ускоренного старения, характерных для данной породы [13], были использованы молодые животные (“молодой” контроль). На момент проведения экспериментов животным, получавшим димебон, и животным “старого” контроля

¹ Институт физиологически активных веществ РАН, Московская обл., 142432, пос. Черноголовка.

² ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва 125315, Балтийская, 8.

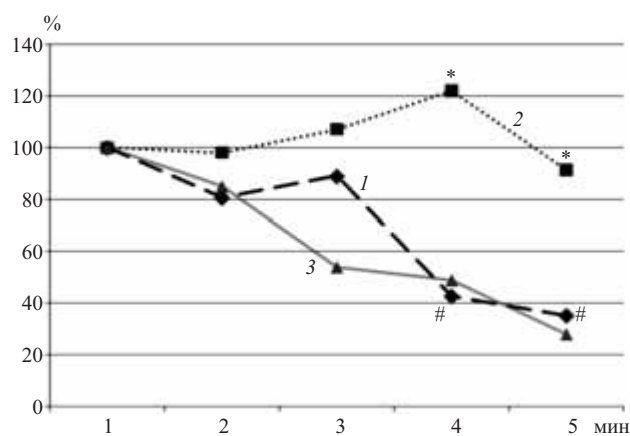


Рис. 1. Влияние димебона (1,5 мг/кг в день в течение 5 мес) на двигательную активность мышей с ускоренным старением (SAMP10) в возрасте 16 месяцев в относительных показателях к первой минуте наблюдения в установке Оптоваримекс.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — количество движений в относительных показателях по отношению к первой минуте (n/1), %. Отличия достоверны от контроля 3 мес, при * — $p \leq 0,05$ (критерий χ^2), от контроля 16 мес, при # — $p \leq 0,05$ (критерий χ^2). 1 — димебон, 2 — контроль (16 мес), 3 — контроль (3 мес).

было 16 месяцев, мышам группы “молодого” контроля — 3 месяца.

Поведенческие эксперименты проводили в первой половине дня. Для оценки поведения и состояния мышей был использован комплекс методов, традиционно применяемых в нейропсихофармакологии [2]. Неврологический дефицит у животных определяли по шкале Stroke-index McGrow. Тяжесть состояния оценивали по сумме соответствующих баллов. Мышечный тонус определяли по подтягиванию задних конечностей на горизонтальной перекладине. Координацию движений изучали в тесте “вращающегося стержня”. Ориентировочно-исследовательское поведение мышей исследовали в условиях методики открытого поля. Показатели поведения (горизонтальные и вертикальные перемещения, обследование отверстий) регистрировали в течение трех минут. В установке Оптоваримекс (“Columbus Instrument”, США) в течение 5 мин регистрировали двигательную активность группы мышей (по 13 животных). Уровень тревожности животных определяли в условиях методики приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ). Мышь помещали на центральную площадку хвостом к светлому рукаву. Регист-

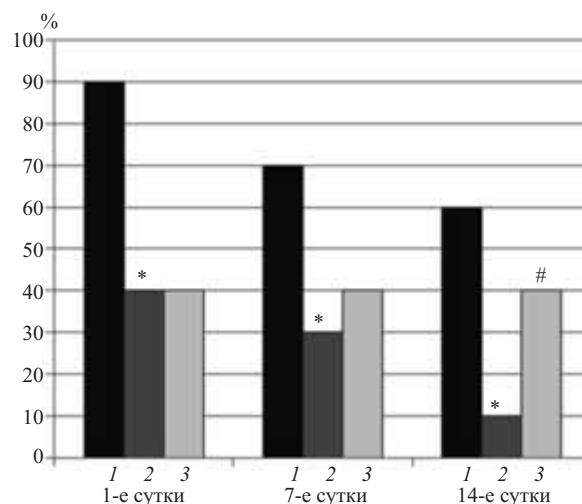


Рис. 2. Влияние димебона при хроническом применении (1,5 мг/кг в день в течение 5 мес) на воспроизведение УРПИ мышью SAMP10.

По оси ординат — количество животных, не зашедших в темную камеру при воспроизведении рефлекса, %. Отличия достоверны от контроля (3 мес), при * — $p \leq 0,01$, от контроля (16 мес), при # — $p \leq 0,01$ (критерий χ^2). 1 — контроль (3 мес), 2 — контроль (16 мес), 3 — димебон (16 мес).

рировали время, проведенное животными в открытых рукавах, число заходов в открытые и закрытые рукава. Общее время наблюдения для каждого животного составляло 5 мин. Обучение условному рефлексу пассивного избегания (УРПИ) проводили в установке Passive avoidance (“Lafayette Instrument Co”, США) по методике [8] в модификации [2]. Животное помещали на светлую платформу хвостом к отверстию, ведущему в темную камеру с электродным полом, и регистрировали латентный период первого захода в затемненное отделение установки. Затем наносили неизбежное электрошоковое раздражение через пол током силой 0,5 мА и длительностью 1 с. Обучение продолжалось до тех пор, пока животное не переставало заходить в опасный отсек. Воспроизводили УРПИ через 24 часа, 7 и 14 сут после обучения.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Биостат с использованием t -критерия Стьюдента, U -критерия Манна-Уитни и критерия χ^2 .

Таблица 1. Влияние димебона при хроническом применении (1,5 мг/кг в день в течение 5 мес) на поведение мышей линии SAMP10 в “открытом поле”

Вещество	Возраст, мес	Количество горизонтальных перемещений	Вертикальная двигательная активность	Обследование отверстий	Суммарные показатели двигательной активности
Контроль	3	71,7 ± 5,1	14,0 ± 1,0	13,4 ± 0,9	99,1 ± 5,1
Контроль	16	42,0 ± 18,5*	3,9 ± 1,6*	5,3 ± 1,2*	51,2 ± 7,1*
Димебон	16	53,2 ± 5,2	4,0 ± 1,4	6,7 ± 0,8	63,8 ± 6,1

* — достоверность отличий от контроля (3 мес), при $p \leq 0,01$ (t -критерий Стьюдента).

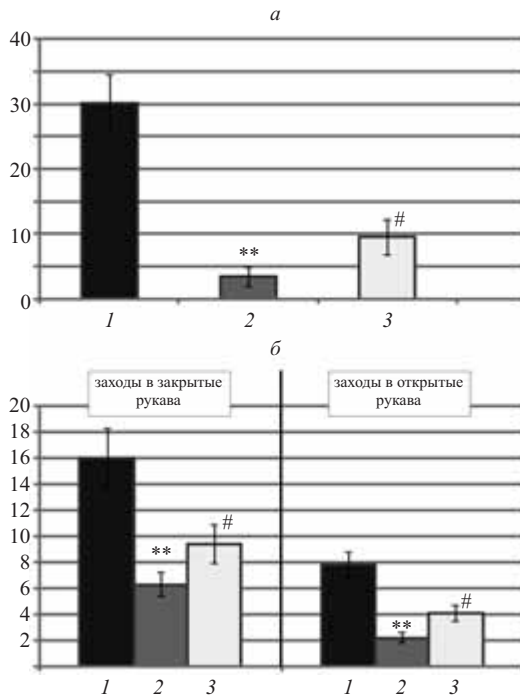


Рис. 3. Влияние димебона при хроническом применении (1,5 мг/кг в день в течение 5 мес) на поведение мышей линии SAMP10 в условиях методики ПКЛ.

а: по оси ординат — время проведенное в открытых рукавах, б: по оси ординат — количество заходов в рукава. 1 — контроль (3 мес), 2 — контроль (16 мес), 3 — димебон 1,5 мг/кг в день в течение 5 мес. Отличия достоверны от контроля (3 мес), при * — $p \leq 0,01$ (t -критерий Стьюдента); от контроля (16 мес), при # — $p \leq 0,05$ (U — критерий Манна-Уитни).

Таблица 2. Влияние димебона при хроническом применении (1,5 мг/кг в день в течение 5 мес) на воспроизведение УРПИ мышей линии SAMP10

Группа животных	Возраст, мес	Латентное время рефлекса, с	Время, проведенное на освещенной площадке
<i>Воспроизведение рефлекса через сутки</i>			
Контроль	3	164,0 ± 16,0	164,0 ± 16,0
Контроль	16	90,7 ± 24,5*	91,4 ± 24,4*
Димебон	16	103,0 ± 22,6	130,0 ± 18,6
<i>Воспроизведение рефлекса на 7-е сутки</i>			
Контроль	3	152,5 ± 16,5	163,0 ± 9,2
Контроль	16	74,5 ± 24,2*	79,5 ± 23,2**
Димебон	16	95,0 ± 23,37	118,5 ± 19,4
<i>Воспроизведение рефлекса на 14-е сутки</i>			
Контроль	3	132,5 ± 20,8	154 ± 12,0
Контроль	16	40,2 ± 16,1**	66,5 ± 18,47**
Димебон	16	89,7 ± 25,23#	112,2 ± 23,54#

Примечание. Отличия достоверны (t -критерий Стьюдента): от контроля (3 мес) при: * — $p \leq 0,05$, ** — $p \leq 0,01$; от контроля (16 мес) при # — $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование неврологического статуса мышей SAMP 10 по шкале McGrow показало, что как у 3-месячных так и у 16-месячных мышей не наблюдали тяжелых неврологических нарушений в виде манежных движений, парезов и параличей. Вместе с тем в отличие от молодых 3-месячных мышей у старых 16-месячных животных в 80 % случаев отмечали вялость и замедленность движений, птоз (40 %). В группе животных, получавших димебон, не отмечали грубых неврологических нарушений, а слабые были выражены в меньшей степени (30 %), чем в контроле у старых мышей. Изучение миорелаксации и координации движений у животных в тестах подтягивания на горизонтальной перекладине и вращающегося стержня не выявило каких-либо заметных изменений во всех трех группах мышей. Животные в 90 – 95 % случаев подтягивали задние конечности на перекладине и удерживались на вращающемся стержне в течение двух минут.

Исследование ориентировочно-исследовательского поведения SAMP10 в открытом поле показало, что у старых животных отмечалось значительное, статистически достоверное уменьшение всех показателей — количества вертикальных и горизонтальных перемещений, числа обследований отверстий (табл. 1). В группе мышей, получавших димебон, наблюдалась тенденция восстановления ориентировочно-исследовательского поведения, особенно по показателю горизонтальных перемещений. В целом, при сравнении суммарных показателей димебон в значительной степени восстановил ориентировочно-исследовательское поведение старых мышей в открытом поле на 25 % (табл. 1).

Исследование двигательной активности группы мышей в установке Оптоваримекс проводили с целью выявления влияния димебона на угашение ориентировочно-исследовательской активности, на так называемое негативное обучение или привыкание. В этом случае у животных ослабевает реакция на новизну и постепенно уменьшается двигательная активность [2, 7]. На рис. 1 видно, что у мышей линии SAMP10 в возрасте трех месяцев к 5-й минуте наблюдения регистрируется постепенное ослабление двигательной активности по отношению к первой минуте, т.е. развивается привыкание к обстановке или негативное обучение. И в этом они не отличаются от молодых беспородных животных. У старых мышей SAMP 10 подобное естественное поведение почти полностью отсутствует и групповая двигательная активность этих мышей на протяжении всего времени наблюдения сохраняется высокой, сходной с показателями в первую минуту. В группе животных, получавших димебон, поведение мышей не отличалось от показателей “молодого” контроля — отмечалось быстрое привыкание к новой обстановке и, соответственно, уменьшение количества перемещений (рис. 1). Таким образом, димебон кор-

ректировал нарушенную у 16-месячных мышей линии SAMP 10 способность к негативному обучению, привыканию к новой обстановке при регистрации групповой двигательной активности.

Исследование обучения мышей линии SAMP 10 УРПИ показало, что при воспроизведении рефлекса через сутки после обучения у 16-месячных мышей в сравнении с 3-месячными животными наблюдалось значительное статистически достоверное уменьшение латентного времени рефлекса и времени, проведенного на освещенной платформе при воспроизведении рефлекса на 1, 7 и 14-е сутки после обучения (табл. 2). Сходные закономерности отмечались и при регистрации количества животных, не зашедших в камеру. Так, если у 3-месячных животных при воспроизведении рефлекса через сутки помнили и не заходили в темную камеру 90 % мышей, через 7 суток — 70 %, через 14 – 60 %, то в группе 16-месячных животных эти показатели составляли 40, 30 и 10 % соответственно (рис. 2). Эти результаты свидетельствуют о существенном нарушении у 16-месячных мышей процессов обучения и памяти. На фоне длительного применения димебона в питьевой воде у 16-месячных мышей наблюдалось улучшение обучения и воспроизведения УРПИ, особенно на 14-е сутки наблюдения: отмечалось статистически достоверное увеличение латентного времени рефлекса (табл. 2) и количества животных, не зашедших в темную камеру (рис. 2).

При регистрации уровня тревожности животных в условиях ПКЛ показано, что у мышей старшего возраста значительно, в 10 раз, уменьшалась величина основного показателя — времени, проведенного животными на открытых рукавах лабиринта (рис. 3, а). Значительно уменьшалось и количество заходов в открытые и закрытые рукава лабиринта (рис. 3, б). Такое поведение животных свидетельствует о повышенном уровне тревожности у SAMP 10 в возрасте 16 месяцев. В группе животных, получавших димебон, отмечалось, хотя и незначительное, но статистически достоверное увеличение всех показателей поведения мышей в ПКЛ (рис. 3), т.е. под действием димебона наблюдалось улучшение тактики поведения мышей в ПКЛ.

Таким образом, показано, что у мышей линии SAMP10 в возрасте 16 месяцев в сравнении 3-месячными животными той же породы отмечалось снижение ориентировочно-исследовательского поведения в открытом поле, нарушение “негативного обучения” при регистрации групповой двигательной активности. Отмечалось повышение уровня тревожности в ПКЛ и ухудшение воспроизведения памятного следа на модели УРПИ, особенно при регистрации поведения через 7 и 14 дней после обучения. В комплексе эти изменения поведения 16-месячных мышей свидетельствуют об ослаблении у них функции высшей нервной деятельности, характерном для старых животных [1, 19].

Поведение мышей, длительно получавших раствор димебона, отличалось от поведения как 16-месячных, так и 3-месячных животных, потреблявших воду. У мышей после димебона в сравнении с 16-месячным контролем наблюдалось достоверное улучшение “негативного обучения” при регистрации двигательной активности группы мышей, снижение уровня тревожности на модели ПКЛ, улучшение воспроизведения УРПИ, особенно, через 7 и 14 сут после обучения.

Таким образом, димебон заметно замедлял у SAMP 10 развитие генетически детерминированного ускоренного старения. Подобное действие препарата определяется его нейропротекторным эффектом [5, 6, 10], который, по-видимому, определяется способностью димебона воздействовать на глутаматергическую систему через модуляцию AMPA- и NMDA-рецепторов [4].

ВЫВОДЫ

1. У мышей линии SAMP10 (Senescence-accelerated mouse prone 10) с генетически детерминированным ускоренным старением в возрасте 16 месяцев в сравнении 3-месячными животными той же породы отмечается снижение ориентировочно-исследовательского поведения в открытом поле, повышение уровня тревожности в приподнятом крестообразном лабиринте, нарушение воспроизведения памятного следа на модели условной реакции пассивного избегания.

2. Димебон при длительном применении в питьевой воде (1,5 мг/кг в день в течение 5 мес) в значительной степени ослабляет нарушения поведения и памяти у 16-месячных мышей с ускоренным типом старения линии SAMP10, корректируя ориентировочно-исследовательское поведение, улучшая воспроизведение условной реакции пассивного избегания, снижая тревожность в приподнятом крестообразном лабиринте.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Анисимов, *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, Наука, Санкт-Петербург (2003).
2. Т. А. Воронина, Р. У. Островская, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2005), сс. 253 – 263.
3. Т. Л. Гарибова, Т. А. Воронина, С. А. Литвинова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, № 4, 3 – 6 (2007).
4. В. В. Григорьев, О. А. Драный, С. О. Бачурин, *Бюл. экспер. биол.*, **136**(11), 538 (2003).
5. Н. Н. Лермонтова, Н. В. Лукоянов, Т. П. Серкова, У. А. Лукоянова, С. О. Бачурин, *Бюл. экспер. биол.*, **129**(6), 640 – 643 (2000).
6. Н. Н. Лермонтова, А. Е. Редкозубов, Е. Ф. Шевцова и др., *Бюл. экспер. биол.*, **132**(11), 545 – 550 (2001).
7. Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, *Экспер. и клин. фармакол.*, № 5, 498 – 500 (1992).
8. R. Ader, W. Weijnen, and P. Moleman, *Psychon. Sci.*, **26**, 125 – 128 (1972).
9. A. Boldyrev, M. Yuneva, E. Sorokina, et al., *Biochemistry Moscow*, **66**, 1157 – 1163 (2001).

10. S. O. Bachurin, E. Bukatina, and N. Lermontova, *Ann. N. Y. Acad.*, **939**(2), 425 – 435 (2001).
11. Eun Young Lee and Min Kyu Lee, *Korean J. Anat.*, **34**(6), 645 – 651 (2001).
12. M. Hosokawa, T. Abe, K. Higuchi, et al., *Mech. Ageing Dev.*, **118**, 61 – 70 (2000).
13. M. Miyamoto, *Exp. Gerontol.*, **32**, 139 – 148, (1997).
14. A. Shimada, H. Keino, M. Satoh, et al., *J. Gerontol A Biol. Sci. MedSci.*, **57**, 415 – 21 (2002).
15. A. Shimada, H. Keino, M. Satoh, et al., *Synapse*, **48**, 198 – 204 (2003).
16. T. Takeda, M. Hosokawa, S. Takeshita, et al., *Mech Ageing Dev.*, **17**, 183 – 194 (1981).
17. T. Takeda, M. Hosokawa, and K. Higuchi., *J. Am. Geriatr Soc.*, **39**, 911 – 919 (1991).
18. Todd A. Carter, Jennifer A. Greenhall, Shigeo Yoshida, et al., *Genome Biology*, **6**, (2005).
19. T. A. Voronina, *Alzheimer disease: therapeutic strategies.*, Giacobini E., Becker (eds.), Birkhauser-Boston, 265 – 269, (1994).

Поступила 24.09.08

EFFECTS OF THE CHRONIC ADMINISTRATION OF DIMEBON ON THE BEHAVIOR AND MEMORY OF SAMP 10 MICE

V. V. Grigor'ev¹, T. L. Garibova², T. A. Voronina², S. A. Litvinova², and S. O. Bachurin¹

¹ Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432, Russia

² Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

SAMP 10 mice with genetically determined senescence (senescence-accelerated mouse prone 10) aged 16 months demonstrated (in comparison to 3-months old animals of the same strain) the following traits typical of old animal: behavior and memory deficiency, exploratory behavior impairment, and elevated level of anxiety. Dimebon administered for a long period of time with drinking water (1.5 mg/kg over 5 months) produced a positive action upon behavior and memory of 16-months-old SAMP10 mice, optimized exploratory behavior in the open field test, diminished anxiety in elevated plus maze test, and improved retrieval of passive avoidance reaction.

Key words: SAMP10 strain mice (Senescence-accelerated mouse prone 10), genetically determined accelerated aging, dimebon, behavior, memory